

2001 год

## **От синтетических полиэлектролитов к полимер-субъединичным вакцинам\***

***В. А. Кабанов***

### **Введение**

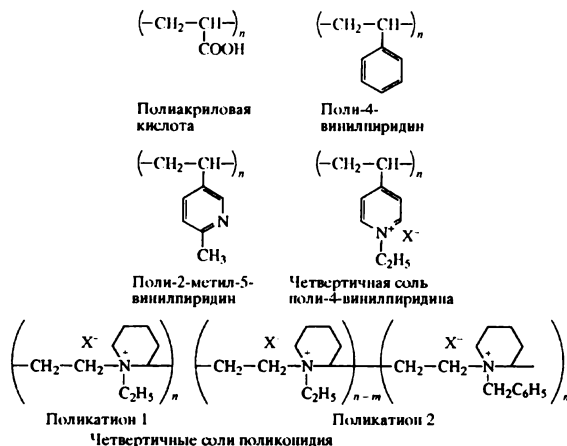
30 с небольшим лет назад случай свел меня с Рэмом Петровым, к тому времени уже видным иммунологом. Оба мы были еще молоды и не отягощены традиционным мышлением. А потому решили дерзнуть и не поленились проверить возникшую у нас, как многим в ту пору показалось бы, пустую идею: использовать синтетические полиэлектролиты (СПЭ), не являющиеся даже далекими аналогами биополимеров, в качестве компонентов для целенаправленного воздействия на иммуногенез. К тому времени было уже хорошо известно, что чужеродные природные полиэлектролиты (белки, полисахариды, нуклеиновые кислоты) и их структурные синтетические аналоги (полипептиды, полинуклеотиды), попав в организм, проявляют свойства антигенов. Это значит, что иммунные клетки узнают их специфические фрагменты (антигенные детерминанты) и в ответ вырабатывают структурно комплементарные белки антитела, которые блокируют эти антигены. Было известно также, что природные полиэлектролиты (полисахариды, нативные нуклеиновые кислоты, двуспиральные синтетические полинуклеотиды), кроме того, активируют иммунную систему по отношению к другим антигенам, т. е. служат в качестве иммуностимуляторов [1–3]. Нам же захотелось узнать, как иммунная система реагирует на незнакомые ей СПЭ, химическая структура которых ничем не напоминает биополимеры. Тогда я передал иммунологам два простых СПЭ винилового ряда, которые в тот

момент оказались под рукой: полиакриловую кислоту (ПАК) и поли-4-винилпиридин (ПВП). Первый полимер способен диссоциировать в водной среде с образованием полианиона, второй – присоединять протоны, образуя соответствующие поликатионы. Эти полимеры мы тогда готовили в достаточно больших количествах и изучали на кафедре высокомолекулярных соединений химического факультета МГУ, преследуя совершенно иные цели.

### **Альтернативный механизм активации иммунных клеток**

Заслуживающие внимания результаты были получены уже в первых сериях опытов, проведенных на мышах. Как и следовало ожидать, незнакомые организму молекулярные цепи ПВП и ПАК сами по себе не были иммуногенны. Однако введение их водных растворов в кровь заметно интенсифицировало образование в костном мозге так называемых стволовых клеток – предшественников всех функциональных клеток иммунной системы, их миграцию и расселение в организме [4]. Кроме того, оказалось, что и ПАК и ПВП, не будучи антигенами, при введении совместно с эритроцитами барана в несколько раз усиливают иммунный ответ на этот типичный тестовый антиген, т. е. служат в качестве иммуностимуляторов [5]. На самом деле иммуностимулирующее действие ПАК *in vivo* еще несколько ранее было обнаружено Diamanstein и др., испытывшими ее наряду с многочисленными природными полианионами [6]. Тогда они не придали этому факту особого значения. Нам же при анализе наших данных показалось удивительным, что полиионы ПАК и ПВП, цепи которых построены из мономерных звеньев различного химического строения и даже различаются знаком заряда, тем не менее, примерно в одинаковой степени стимулируют иммунный ответ.

На этом этапе стало ясно, что игра стоит свеч и проблема заслуживает дальнейшей разработки в качестве специального проекта. Тогда мы организовали группу из нескольких химиков – выпускников химического факультета МГУ и иммунологов из числа учеников Р. В. Петрова, среди которых Р. М. Хаитов вскоре стал играть ведущую роль. Усилия группы были целиком направлены на синтез и выяснение механизма действия СПЭ как иммуностимуляторов. Расширив круг СПЭ, мы убедились, что подобно ПВП и ПАК действуют и многие другие химические структуры. Ниже приведены формулы лишь некоторых из них.



Все изображенные выше полиэлектролиты в несколько раз усиливали иммунный ответ мышей на эритроциты барана. Дальнейшие исследования показали, что структурное разнообразие потенциальных иммуностимуляторов в ряду СПЭ практически не ограничено.

Этот неожиданный результат позволил предположить, что различные СПЭ воздействуют на иммунную систему по какому-то общему механизму, связанному с их полимерной природой, в частности со способностью макромолекул СПЭ к многоцентровому взаимодействию с иммунными клетками. Предположение подтвердилось. Рисунок 1 показывает, что низкомолекулярные аналоги типичных СПЭ-

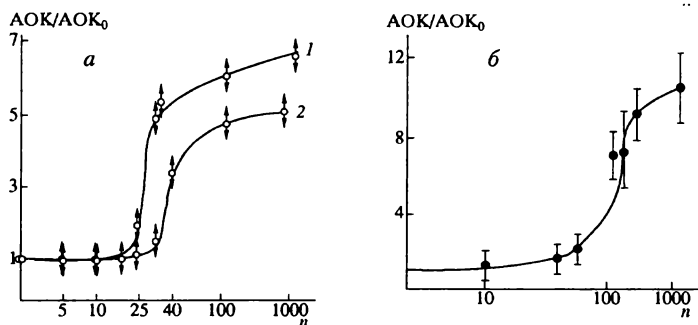


Рис. 1. Зависимость относительного числа АОК в селезенке мышей от степени полимеризации поликатиона 1 (1), поликатиона 2 (2) (а) и ПАК (б). Доза антигена (эритроцитов барана)  $5 \times 10^6$ , доза иммуностимулятора 50 мг/кг

иммуностимуляторов не проявляют никакой активности при испытаниях *in vivo*. Эффект возникает лишь по достижении некоторых достаточно высоких значений степени полимеризации [7–9].

Известно, что для запуска естественного процесса выработки антител в организме требуется весьма сложное специфическое взаимодействие (кооперация) нескольких разновидностей иммунных клеток [10, 11]. Упрощенная схема такой кооперации представлена на рис. 2 [10]. Основные ее участники: Т-лимфоциты-помощники ( $T_H$ ),

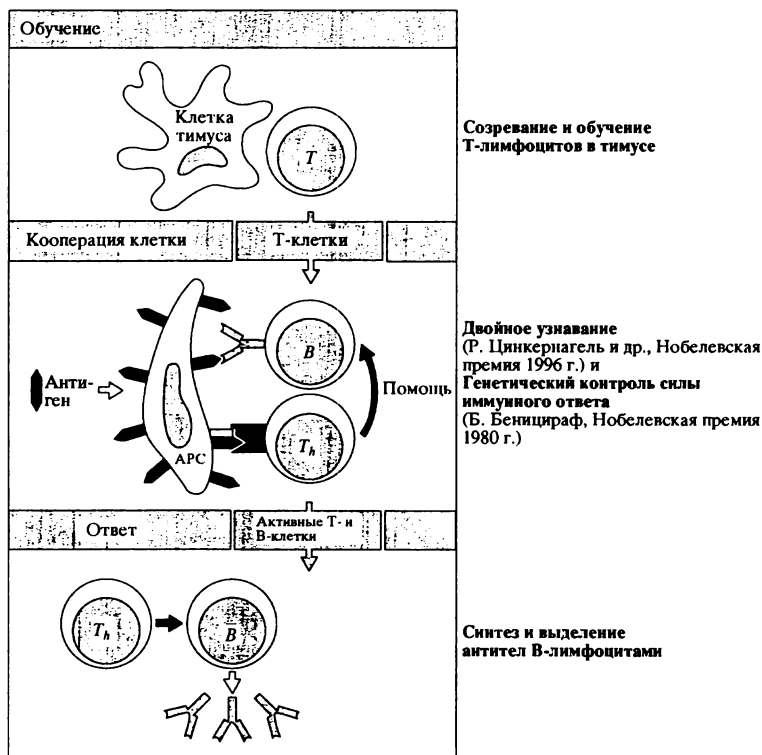


Рис. 2. Взаимодействие иммунных клеток при образовании специфических антител в ответ на введение антигена [10]

антиген представляющие клетки (АРС) (макрофаги – одна из их разновидностей), а также В-лимфоциты – клетки, производящие антитела. Все они формируются путем дифференциации расселившихся

стволовых клеток.  $T_h$ -лимфоциты формируются в тимусе (зобной железе). В ходе формирования и развития они «обучаются» отличать попавшие в организм чужие антигены от своих собственных тканей (верхняя часть схемы). Для этого клетка синтезирует белковые рецепторы, которые располагаются на ее поверхности. Рецептор каждого  $T_h$ -лимфоцита способен участвовать в узнавании только одного антигена, вернее его характеристического фрагмента – антигенной детерминанты. Столь же специфичные узнающие рецепторы присутствуют и на поверхности В-лимфоцитов, сформировавшихся в костном мозге. Однако между рецепторами В- и  $T_h$ -клеток существует принципиальное различие. Первый самостоятельно узнает структурно комплементарную ему антигенную детерминанту. Второму для узнавания необходим соучастник – пептид строго определенной структуры (двойное узнавание). Структура эта запрограммирована в генах иммунного ответа (IR-генах), которые входят в состав главного комплекса гистосовместимости. Иными словами, чтобы  $T_h$ -лимфоцит узнал чужой антиген, геном данной особи должен содержать соответствующий IR-ген. Попавший в организм антиген захватывается APC-клеткой. Там он расщепляется на фрагменты, пригодные для взаимодействия с узнающими рецепторами  $T_h$ - и В-лимфоцитов. Там же с участием IR-гена синтезируется упомянутый выше вспомогательный пептид. Затем APC-клетка представляет  $T_h$ -лимфоциту узнаваемую им комбинацию, состоящую из фрагмента антигена и IR-ген зависимого пептида, а В-лимфоциту – только узнаваемый им антигенный фрагмент. Создавшаяся таким образом стартовая ситуация изображена в средней части схемы рис. 2. В этой ситуации  $T_h$ -лимфоцит посылает в «помощь» В-лимфоциту сигнал в виде особого пептида-медиатора (цитокина). Лишь после получения такого сигнала В-лимфоциты начинают размножаться и продуцировать антитела, т. е. включается специфический иммунный ответ на попавший в организм антиген (нижняя часть схемы). Понятно, что иммунная система сможет довести до конца всю описанную выше цепь взаимосвязанных клеточных взаимодействий, только если в геноме присутствует необходимый IR-ген. В противном случае специфического иммунного ответа не будет. Именно на этом принципе основан существующий в природе генетический контроль силы иммунного ответа. Описанная обобщенная схема клеточной кооперации – один из краеугольных камней современной иммунологии. Труды, послужившие ее созданию, в свое время были отмечены тремя Нобелевскими премиями по медицине.

Тем более удивительным представился нам еще один факт, который выявился в опытах *in vitro*. Небольшие количества СПЭ, добавленные к взвеси изолированных В-лимфоцитов, активировали синтез ДНК, вызывали деление, а в присутствии антигенов – антигензависимую дифференцировку клеток, т. е. запускали иммунный ответ прямо в пробирке без помощи других клеток иммунной системы [8, 9].

Объяснение было найдено путем изучения биохимических и физико-химических последствий воздействия СПЭ на В-лимфоциты. Оказалось, что при добавлении водного раствора ПАК к суспензии В-лимфоцитов резко возрастает ионная проницаемость внешней мембраны клетки. В частности, поток ионов калия устремляется из клетки в окружающий раствор, где их концентрация ниже, чем во внутриклеточном пространстве (рис. 3а). Другие водорастворимые СПЭ действуют аналогичным образом. В отличие от них водорастворимые электронейтральные полимеры никакой активности не проявляют (рис. 3б). Ионы кальция, концентрация которых выше в

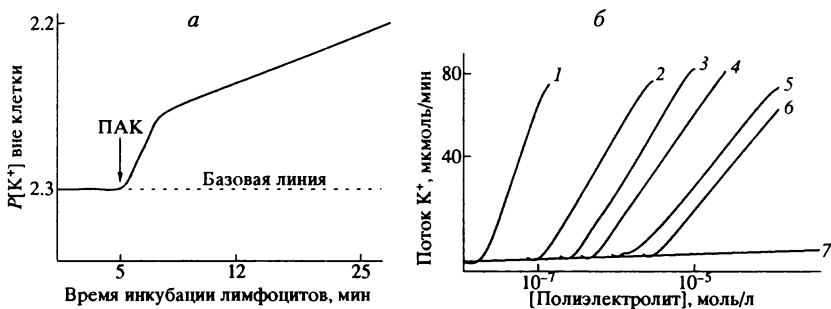


Рис. 3. Влияние полиэлектролитов на проницаемость мембран В-лимфоцитов для ионов  $K^+$  *in vitro*: а – кинетика установления усиленного стационарного потока при добавлении в культуру клеток раствора ПАК; б – зависимость стационарных потоков ионов  $K^+$  от концентрации различных полиэлектролитов; 1 – ПЭП, 2 – ПЭП, содержащий 3 мол. %  $C_{16}H_{33}$  заместителей, 3 – поли-L-лизин, 4 – ПАК, 5 – диметиламиноэтил-метакрилат, 6 – декстрансульфат, 7 – поли-4-винилпиридиний-N-оксид (неионогенный полимер, приведенный для сравнения)

окружающем растворе, напротив, устремляются внутрь клетки (рис. 4). Иными словами, под воздействием СПЭ в клеточной мембране образуются поры, сквозь которые ионы начинают диффундировать в направлении градиента концентрации. Электронные микрофотографии продольных сколов мембраны показывают, что обработка

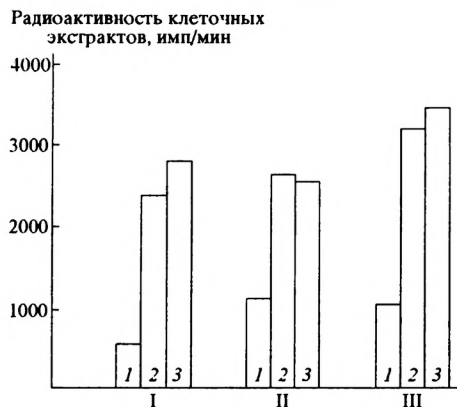


Рис. 4. Влияние полиэлектролитов на прохождение экзогенных ионов  $\text{Ca}^{2+}$  сквозь мембраны В-лимфоцитов *in vitro*: 1 – контрольные клетки, 2 – ПАК ( $n = 1100$ ), 3 – ПЭП ( $n = 740$ ); I, II, III – номера опытов

индивидуальных клеток СПЭ приводит к агрегации мембранных белков (рис. 5) [8, 9].

Явление агрегации белковых глобул, связывающихся с линейными полиэлектролитами в водных растворах, к тому времени уже было известно и хорошо изучено [12–14]. Центрами связывания в

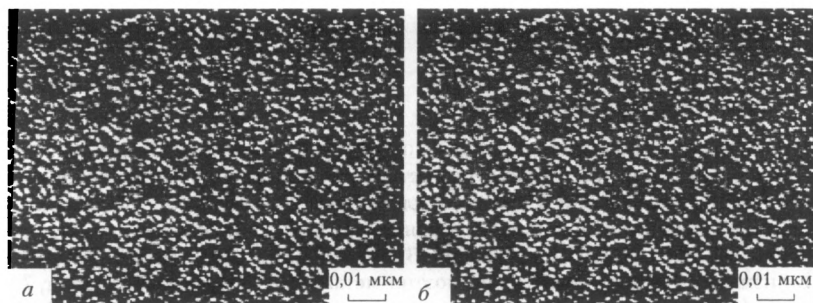
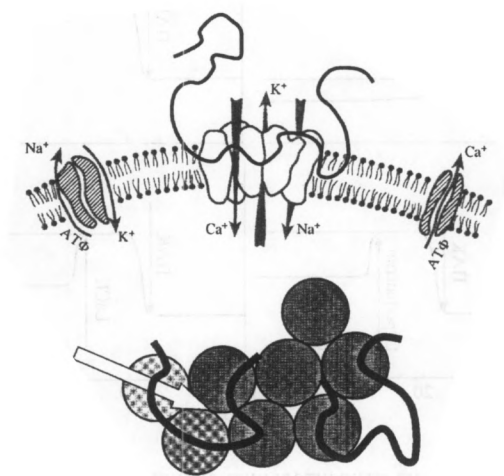


Рис. 5. Микрофотографии продольных сколов мембраны В-лимфоцитов *in vitro*: а – необработанный образец, б – образец, обработанный полиэлектролитом

первую очередь служат ионные группы на поверхности глобул, заряд которых противоположен заряду СПЭ. Кроме того, в зависимости от химической структуры полииона и белка связывание может происходить в результате донорно-акцепторного или гидро-

фобного взаимодействия. Такие центры связывания имеются и на экспонированных в водной фазе поверхностях плавающих в липидном бислое мембранных белков. Поэтому было естественно предположить, что именно они служат центрами сорбции СПЭ на внешней мембране клетки, а мембранные белки, взаимодействуя с полиионом, собираются в двухмерные кластеры по механизму, сходному с тем, который реализуется в водных растворах. Тогда в роли пор, по всей вероятности, выступают промежутки между агрегированными белковыми глобулами наподобие тех, что остаются между плотно упакованными на плоскости бильярдными шарами. Ниже представлена предполагаемая схема.



Известно, что энергию, необходимую для поддержания жизнедеятельности, любая клетка получает из одного универсального источника: реакции окисления аденазинтрифосфата (АТФ). В частности, естественный ионный баланс в клетке поддерживают мембранные ферменты: ( $K^+$ ,  $Na^+$ ) и  $Ca^{2+}$  АТФазы. Эти молекулярные насосы способны транспортировать ионы сквозь мембрану против градиента их концентрации. Для выполнения такой работы они расходуют энергию, запасенную в АТФ. Парциальное потребление АТФ каждой из АТФаз можно оценить путем добавления в культуру клеток избирательно действующих ингибиторов.



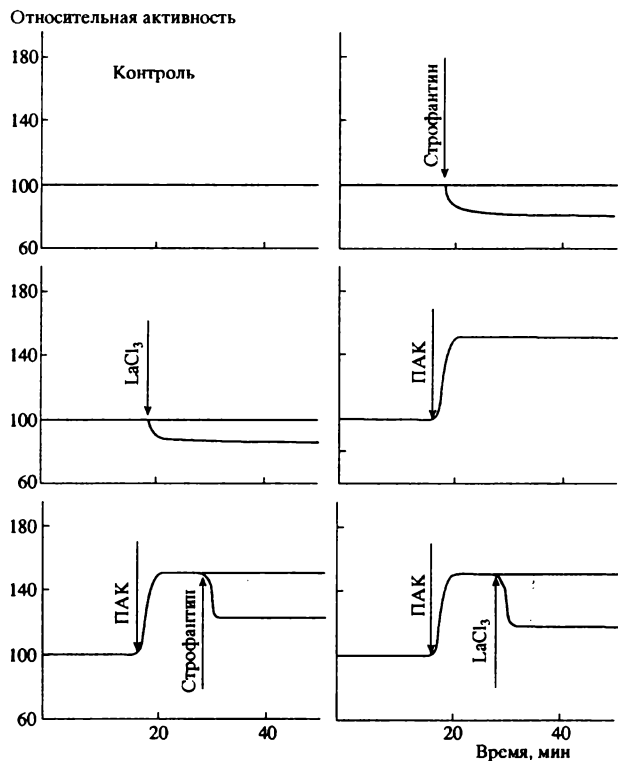


Рис. 6. Влияние ПАК на относительную активность  $K^+$ ,  $Na^+$  и  $Ca^{2+}$ -АТФаз. Пояснения в тексте

В верхней части рис. 6 показано, что общее относительное потребление АТФ В-лимфоцитами действительно снижается при добавлении оубаина (строфантина) и соли лантана – специфических ингибиторов соответственно ( $K^+$ ,  $Na^+$ ) и  $Ca^{2+}$  АТФаз. Из данных, приведенных в нижней части рис. 6, следует, что введение ПАК в водную суспензию В-лимфоцитов вызывает резкое увеличение относительного потребления клетками АТФ, а ингибиторный анализ показывает, что это увеличение и в самом деле обусловлено дополнительной активацией АТФаз [15, 16]. Нарушение естественного состояния клетки из-за вытекания ионов калия и притока дополни-

тельного количества ионов кальция приводит к компенсаторному включению молекулярных насосов, а это, в свою очередь, служит сигналом к запуску и других внутриклеточных систем. Иными словами, клетка начинает делать то, что ей свойственно. В частности, В-лимфоциты начинают делиться и дифференцируются, синтезируя рецепторы для узнавания присутствующих антигенов и тем самым готовясь производить комплементарные им антитела. Характерно, что циклазные ферменты – неперенные участники реакции иммунных клеток при обычном механизме запуска иммунной системы, в данном случае практически не активируются.

Приведенные экспериментальные факты позволили нам сделать еще одно важное заключение: при контакте с иммунной клеткой СПЭ выполняет функцию незнакомого ей триггерного фактора. Он действует по альтернативному механизму в обход некоторых предусмотренных природой ключевых событий, в частности упомянутого выше двойного узнавания. В самом деле, в описанных выше системах *in vitro* Т<sub>h</sub>-лимфоциты (неперенные участники процесса двойного узнавания) просто отсутствовали. Это заключение полностью согласуется с результатами, полученными при использовании «живых пробирок» – экспериментальных мышей, искусственно лишенных Т-клеток путем хирургического удаления тимуса и  $\gamma$ -облучения костного мозга. Вместе с тем В-лимфоциты, созревающие и дифференцирующиеся в селезенке, у таких мышей остаются (поэтому иммунологи называют их В-мышами). Не имея Т-клеток, В-мыши не способны дать обычную иммунную реакцию на введенные антигены. Однако при введении тех же антигенов в смеси с СПЭ у них вырабатывается практически столь же сильный иммунный ответ, как и у нормальных мышей.

Следовательно, СПЭ, стимулируя развитие иммунной реакции, используют для ее запуска альтернативный механизм не только *in vitro*, но и *in vivo*. Впрочем, о том же свидетельствуют и данные рис. 7, демонстрирующего поразительный параллелизм зависимостей интенсивности трансмембранного ионного потока *in vitro* и коэффициента усиления иммунного ответа *in vivo* от степени полимеризации СПЭ.

### **Полиэлектrolитный иммуностимулятор для человека**

Возможность практического использования СПЭ в качестве иммуностимуляторов представлялась весьма заманчивой прежде всего именно потому, что сами они не иммуногенны. Это значит, что такой СПЭ, усиливая иммунный ответ на попавшие в организм

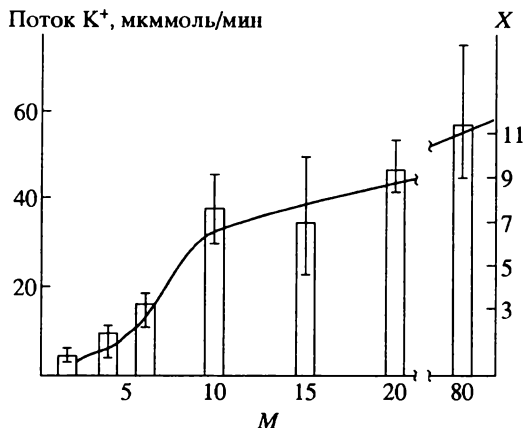
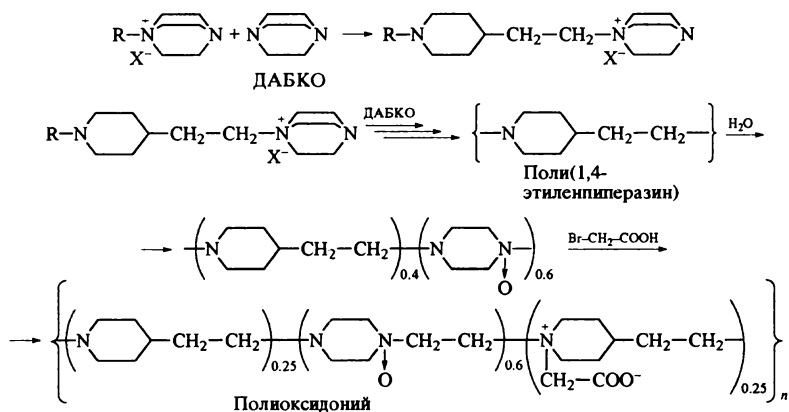


Рис. 7. Зависимость потока ионов  $K^+$  сквозь мембраны В-лимфоцитов *in vitro* и усиления иммунного ответа *in vivo* от молекулярной массы ПАК. X – максимальный коэффициент стимуляции

антигены, не заставит иммунную систему попусту растрачивать ресурсы на выработку антител к самому себе. Кроме того, установленный факт запуска иммунной системы без участия Т-клеток-помощников, через посредство которых гены главного комплекса гистосовместимости контролируют силу иммунного ответа, позволяя надеяться на возможность фенотипической коррекции действия иммунной системы, т. е. компенсации иммунодефицита у конкретных особей, генетически слабо защищенных от микробов – носителей данного антигена. Главной задачей, естественно, стало создание СПЭ, который можно было бы вводить человеку без вредных побочных последствий. Для синтеза исходных макромолекул была использована ранее открытая и детально изученная полимеризация стерически напряженных бициклических аминов с раскрытием одного из циклов [17–19]. В подходящих условиях эта реакция протекает по механизму «живых» цепей и потому позволяет получать линейные полиамины, характеризующиеся строго заданной степенью полимеризации и очень узким ММР. В качестве исходного мономера по ряду причин (в том числе по технико-экономическим показателям) был выбран 1,4-дiazобицикло(2,2,2)октан (ДАБКО) (триэтилендиамин). Его полимеризация по механизму «живых» цепей ведет к образованию поли-1,4-этиленпиперазина с выходом,

близким к 100 %. Из этого полимера путем окисления части его звеньев пероксидом водорода до N-оксида и последующей кватернизации бромуксусной кислотой был синтезирован нетоксичный поликатионный иммуностимулятор [20, 21], который прошел все необходимые испытания и был разрешен в России для медицинского применения. Сегодня его можно купить в аптеках под фирменным названием «Полиоксидоний». Решение этой задачи – результат многолетнего совместного труда химиков и иммунологов, вовлеченных в проект. Ниже приведена схема синтеза и структурная формула полиоксидония, который представляет собой водорастворимый тройной сополимер.



Ключевую роль в драматическом снижении острой токсичности, обычно свойственной полиаминам, здесь играют N-оксидные группы, в первую очередь потому, что они «разбавляют» звенья полимерной цепи, содержащие аминогруппы. Тем самым до безопасного для организма уровня снижается линейная плотность положительных зарядов, которые возникают в результате протонирования свободных аминогрупп. При этом, однако, сополимер не теряет растворимости в воде, поскольку электронейтральные N-оксидные группы представляют собой гидрофильные диполи. Известно, что в отличие от полиаминов поли-N-оксиды вообще нетоксичны. Но будучи инертными в отношении мембранных белков, они, понятно, не могут служить триггерами для запуска иммунной системы. При разработке полиоксидония опытным путем было найдено оптимальное соотношение аминогрупп и N-оксидных групп, при котором токсичность сополимера уже снижена до вполне приемлемого уровня,



ний» стал первым в мире и пока единственным синтетическим полимером, обладающим собственной биологической активностью, который разрешен и уже несколько лет успешно применяется в медицине в качестве препарата для внутреннего введения.

Из сказанного выше следует, однако, что действие «Полиоксидония» как иммуностимулятора неспецифическим образом рассредоточено по многим компонентам иммунной системы. Для иммуностимулятора эта широта – безусловный плюс. Но такой стимуляции недостаточно, чтобы вызвать в организме целенаправленно сильный иммунный ответ на конкретный антиген или конкретную группу антигенов в обход IR-генного контроля.

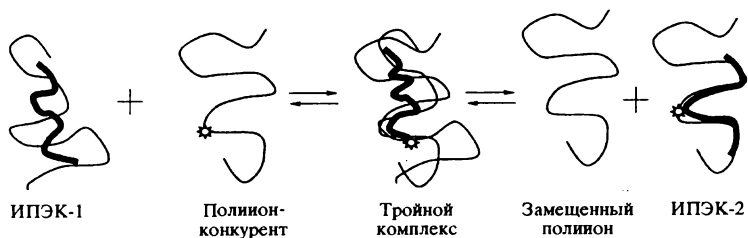
### **Молекулярное узнавание**

Для достижения целенаправленно сильного иммунного ответа по меньшей мере необходимо сфокусировать действие СПЭ, обеспечив его «адресную» доставку и избирательную сорбцию на поверхности соответствующих В-лимфоцитов. В качестве «адреса» не трудно химически привязать к полимерной цепи нужный (по терминологии молекулярных биологов) «вектор»: антиген или антигенную детерминанту. Тогда, если полученный конъюгат, блуждая между различными клетками в организме, случайно достигнет той, на поверхности которой имеются комплементарные данному антигену рецепторы, его детерминанта получит возможность связаться с рецептором. Образование такой связи, фиксирующей СПЭ на поверхности мембраны, будет означать, что конъюгат «узнал» клетку, которой он был адресован.

Не очевидной представлялась сама возможность свободного блуждания введенного в организм конъюгата антиген – СПЭ в поисках клетки-адресата. Дело в том, что узнавание на молекулярном уровне всегда происходит методом проб и ошибок. Следовательно, конъюгату, прежде чем найти нужную клетку, предстоит в ходе теплового движения вступить во множество временных пробных контактов с огромным числом других клеток, не наделенных адекватными рецепторами. Способен ли он это сделать в условиях организма? Известно, что длинноцепочечные полимеры обычно необратимо сорбируются на поверхностях и из-за кооперативности взаимодействия не покидают поверхность сорбента даже при очень большом (в пределе бесконечном) разбавлении раствора. Клеточная мембрана – хороший сорбент для всех полиэлектролитов, запускающих иммунный ответ, особенно для поликатионов. Поэтому возникало

естественное опасение, что конъюгаты, адресованные определенному клону В-лимфоцитов, сразу прилипнут к другим клеткам, имеющимся в огромном избытке, и не смогут достичь адресата.

Вместе с тем при постановке этой проблемы мы уже располагали косвенными данными, которые позволяли надеяться, что механизм поиска конъюгатом нужных клеток методом проб и ошибок на самом деле все же существует, несмотря на упомянутые ограничения. Эти данные были получены при изучении поведения комплексов, которые образуются из двух противоположно заряженных полиэлектролитов в водных растворах. Поликатион и полианион в таком интерполиэлектrolитном комплексе (ИПЭК) соединяются друг с другом множеством солевых связей, которые могут диссоциировать только кооперативным образом. Поэтому в определенных интервалах pH и ионной силы ИПЭК абсолютно устойчивы и не расщепляются на исходные компоненты при разбавлении. Тем не менее, к числу фундаментальных свойств ИПЭК относится их способность вступать в конкурентные реакции обмена и замещения с другими полиэлектролитами [23, 24]. Такие реакции не требуют предварительной диссоциации ИПЭК на исходные компоненты. Они протекают путем образования промежуточных тройных комплексов, как это показано на приведенной ниже схеме, где полиион, изображенный полужирной линией, и полиионы, изображенные тонкими линиями, несут противоположные заряды, а присутствующие в системе низкомолекулярные противоионы для простоты не обозначены.



На самом деле для превращения ИПЭК-2 в ИПЭК-1, т. е. переноса «толстого» полииона с одного «тонкого» партнера на другой, вовсе не требуется, чтобы ИПЭК-1 предварительно диссоциировал на исходные компоненты. В пределах тройного комплекса такой перенос с определенной вероятностью происходит путем флуктуа-

ционной перегруппировки ионных пар, связывающих противоположно заряженные полиионы. При этом энергия, расходуемая на разрыв одной ионной связи, сразу возвращается в результате образования новой, ей эквивалентной. Более того, если звездочка, которой помечен один из «тонких» полиионов, обозначает функциональную группу, способную дополнительно стабилизировать ИПЭК, то «толстый» полиион фиксируется в составе ИПЭК-2. После многочисленных проб и ошибок это происходит, даже если непомеченные «тонкие» полиионы присутствуют в системе в большом избытке. Иными словами, «толстый» и помеченный «тонкий» полиионы находят и узнают друг друга. Замечательно, что для этого не требуется большого числа стабилизирующих групп, а достаточное для узнавания дополнительное сродство в расчете на одну звездочку обеспечивается энергией связи, лишь в несколько раз превышающей энергию теплового движения. Так, например, поли(N-этил-4-винил пиридиниевые) катионы (ПЭП) в водном растворе методом проб и ошибок точно узнают среди полиметакрилат анионов те, что помечены одной пиренильной группой в расчете на 1000–1500 мономерных звеньев [25]. В данном случае дополнительное сродство привносится гидрофобным взаимодействием пиренильной группы с углеводородными фрагментами цепи ПЭП.

Однако было далеко не очевидно, что механизм молекулярного узнавания, подобный экспериментально установленному для противоположно заряженных полимерных цепей, может действовать также и в системах типа полиион-клетка, где каждая клетка-партнер гораздо массивнее полиэлектролитной цепи, а линейные размеры клетки намного превышают контурную длину взаимодействующего с ней полииона. Для устранения сомнений требовались более адекватные модельные системы.

В качестве грубой модели отдельной клетки мы использовали относительно крупные частицы полистирольного латекса (5 мкм в диаметре). Поверхность каждой частицы была покрыта химически связанными с ней сульфогруппами и потому отрицательно заряжена, подобно внешним мембранам большинства клеток. Понятно, что такая частица – сильный сорбент для поликатионов.

Первая задача заключалась в том, чтобы выяснить, могут ли поликатионы, необратимо адсорбированные на отрицательно заряженной поверхности, свободно мигрировать в адсорбционном слое. Для этого упомянутый выше латекс смешивали с водным раствором поли-L-лизина, модифицированного небольшим количеством флуорес-



цеинизотиоцианильных (ФИТЦ) групп. В результате флуоресцентно меченные поликатионы адсорбировались на поверхности латексных частиц. Затем выбирали одну такую частицу, в водной среде освещали ее светом с длиной волны в области поглощения ФИТЦ-групп и с помощью оптического микроскопа наблюдали характерную для них зеленую флуоресценцию. В исходном состоянии зеленый свет равномерно излучала вся поверхность частицы, что свидетельствовало о равномерном распределении флуоресцентных меток в адсорбционном слое. Убедившись в этом, на центр флуоресцирующей поверхности направляли мощный лазерный пучок, толщина которого (2,5 мкм) была несколько меньше диаметра частицы. В зоне воздействия пучка происходила частичная фотодеструкция ФИТЦ-групп. Соответственно на поверхности появлялось пятно с несколько ослабленной флуоресценцией.

Ответ на вопрос был получен путем наблюдения и измерения во времени интенсивности флуоресценции после прекращения действия лазерного пучка. Оказалось, что свечение пятна постепенно восстанавливалось. Через 15–20 мин вся поверхность частицы вновь начинала равномерно излучать. Этот результат однозначно доказывал, что поликатионы, адсорбированные на контактирующей с водой протяженной отрицательно заряженной поверхности, могут достаточно быстро перемещаться в адсорбционном слое, обмениваясь местами друг с другом. Именно таким образом часть «отбеленных» полимерных цепей покидает облученную лазером область. На смену им с не подвергавшейся лазерному воздействию периферии приходят другие свободно блуждающие поликатионы вместе с сохранившимися в их составе флуоресцентными группами. По скорости восстановления флуоресценции была оценена величина коэффициента двухмерной самодиффузии поли-*L*-лизина в адсорбционном слое  $D = (2-6) \times 10^{-8} \text{ см}^2/\text{с}$  [26].

Грубой моделью совокупности клеток нам служил монодисперсный ПС-латекс с диаметром частиц около 0,5 мкм. В данном случае их поверхность была покрыта химически привязанными к ней карбоксильными группами (в среднем 1 группа на  $25 \text{ \AA}^2$ ) и потому также отрицательно заряжена в нейтральной и щелочной средах [27, 28]. Эту модель мы выбрали, чтобы выяснить, могут ли адсорбированные поликатионы переходить с поверхности одной крупной отрицательно заряженной частицы на другую [27, 29]. В качестве поликатиона был использован ПЭП со степенью полимеризации около  $10^3$ . К разбав-

ленному латексу добавляли водный раствор ПЭП, варьируя соотношение положительно заряженных пиридиновых звеньев, приходящихся на один отрицательный заряд поверхности. Для каждого зарядового отношения в одной серии опытов измеряли электрофоретическую подвижность латексных частиц, характеризующую величину и знак их заряда, а в другой, параллельной – количество ПЭП, остающегося в растворе после осаждения латекса с помощью препаративной центрифуги. Полученные данные приведены на рис. 8.

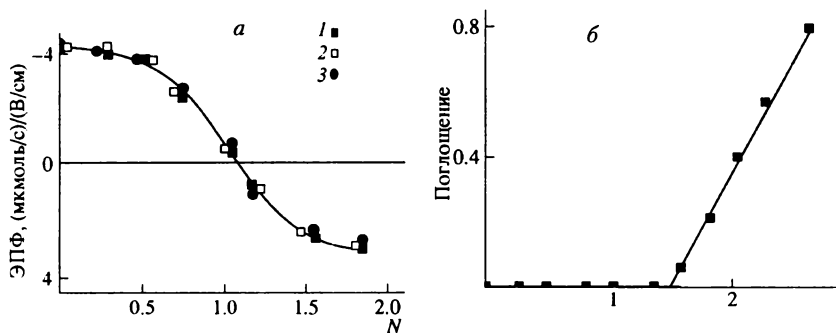


Рис. 8. Зависимость электрофоретической подвижности (ЭФП) латексных частиц (а) и поглощения ПЭП в надосадочной жидкости (б) от соотношения числа звеньев N ПЭП к числу карбоксильных групп на поверхности латексных частиц. Концентрация латекса:  $9 \times 10^9$  (1),  $1,8 \times 10^{11}$  (2) и  $1,8 \times 10^{12}$  (3) частиц/л

Видно, что по мере увеличения содержания ПЭП исходный отрицательный заряд частиц уменьшается, а затем при избытке ПЭП происходит их перезарядка: значения электрофоретической подвижности становятся положительными (рис. 8а). Очевидно, что избыточный положительный заряд несут экспонированные в раствор петли и хвосты адсорбированных поликатионов. Существенно, что размер получившихся положительно заряженных частиц не отличался от размера исходных. Важно отметить также, что ход зависимости электрофоретической подвижности от зарядового отношения не менялся при варьировании исходной частичной концентрации латекса в пределах, превышающих 2 десятичных порядка.

Последнее означает, что в области изученных зарядовых отношений все добавленные поликатионы прочно адсорбируются на поверхности латекса и не десорбируются при разбавлении системы. О необратимом характере адсорбции свидетельствуют также данные

рис. 8б, который характеризует влияние исходного зарядового отношения на оптическую плотность надосадочной жидкости, измеренную после осаждения латекса. Видно, что в области поглощения ПЭП оптическая плотность остается равной нулю вплоть до насыщения поверхности частиц адсорбирующимися на них поликатионами. Как и следовало ожидать, содержание ПЭП в надосадочной жидкости начинает линейно расти только после того, как достигнуто насыщение.

Тем не менее, две следующих серии опытов однозначно показали, что, несмотря на необратимость адсорбции, эффективный механизм миграции поликатионов с поверхности одной отрицательно заряженной частицы на другую на самом деле все же существует. Чтобы получить ответ на вопрос, мы просто смешали суспензию исходных отрицательно заряженных частиц с суспензией тех, что приобрели положительный заряд благодаря адсорбции поликатионов. На рис. 9 представлены результаты измерений электрофорети-

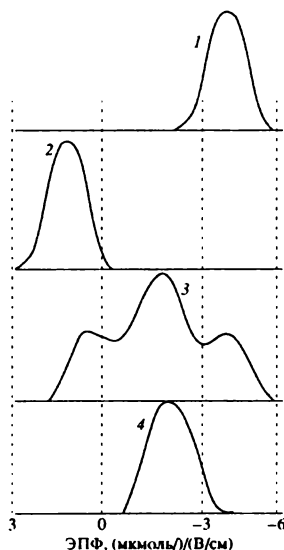


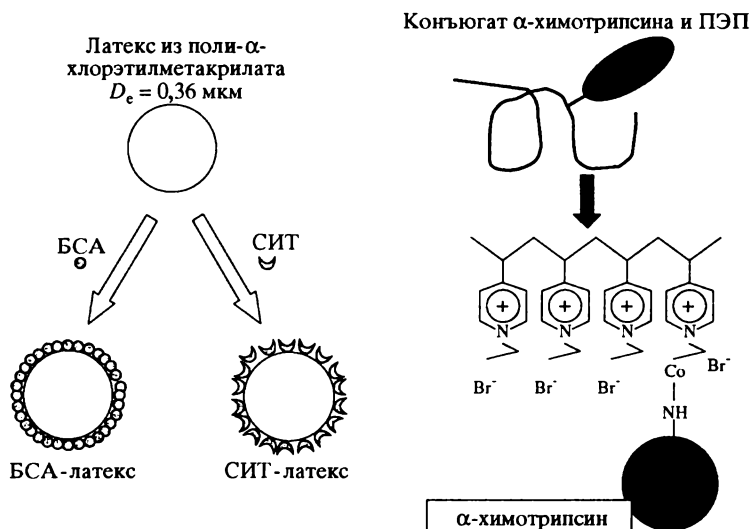
Рис. 9. Экспериментальное доказательство миграции адсорбированного ПЭП между частицами латекса. Электрофоретическая подвижность латексных частиц: 1 – исходных, 2 – перезаряженных адсорбированным ПЭП, 3 и 4 – после смешения 1 и 2, через 5 и через 40 мин соответственно

ческой подвижности и размера частиц, проведенные параллельно через различные промежутки времени после смешения. Данные, полученные через 5 мин, свидетельствовали о кардинальных переменах, произошедших за это время в реакционной системе. Наряду с частицами, характеризующимися значениями электрофоретической подвижности, близкими к исходным, появились другие, электрофоретическая подвижность которых имела промежуточное значение. В то же время по меньшей мере на порядок увеличился средний размер, свидетельствуя об агрегации исходных частиц. Однако эти перемены, как оказалось, были временными и относились к промежуточному состоянию системы. Измерения, проведенные через 40 мин, показали, что диаметр частиц вернулся к исходной величине и главное, что величина электрофоретической подвижности теперь уже у всех частиц приняла промежуточное значение. Проведенный эксперимент однозначно доказал, что поликатионы могут мигрировать не только в адсорбционном слое каждой отдельной частицы, но и переходить с поверхности одной частицы на поверхность другой. Стал ясен и механизм, по которому все это происходит. Сразу после смешения исходные отрицательно заряженные латексные частицы, встречаясь с заряженными положительно, связываются друг с другом за счет электростатического притяжения и образуют агрегаты. Понятно, что минимум свободной энергии системы соответствует равномерному распределению поликатионов между частицами внутри агрегата. Как следует из приведенных данных, в такое состояние система приходит за весьма умеренные времена, что, собственно, и доказывает возможность поликатионов не только диффундировать по поверхности отдельной латексной частицы, но и «переползать» с одной частицы на другую в местах их временно установившихся контактов. При равномерном распределении поликатионов внутри агрегата выравнивается и заряд латексных частиц, а следовательно, утрачивается их взаимное электростатическое притяжение.

Тогда под действием теплового движения агрегаты диспергируются до частиц исходного размера.

Таким образом, было показано, что поликатиону на самом деле кинетически не запрещено методом проб и ошибок искать среди множества отрицательно заряженных частиц одну, которой он может быть адресован. «Адресом» должна служить прикрепленная к поликатиону молекула, способная узнать структурно комплементарный ей рецептор, прикрепленный к поверхности частицы-адресата. В качестве таких партнеров мы выбрали фермент  $\alpha$ -химотрипсин (ХТ) и другой

белок-соевый ингибитор трипсина (СИТ) [29, 30]. Последний, связываясь с ХТ, полностью угнетает его каталитическую активность. Элементы системы, использованной для моделирования процесса узнавания клетки конъюгатом поликатион-антиген, изображены на следующей схеме:



Моделями клеток служили две разновидности модифицированных частиц латекса (0,36  $\mu\text{мкм}$  в диаметре) из поли- $\alpha$ -хлоракрилата. К поверхности одних пришивали ковалентными связями СИТ, к поверхности других – бычий сывороточный альбумин (БСА). Эти белки имеют близкие молекулярные массы. Их изоэлектрические точки расположены в кислой области рН. Поэтому в нейтральной среде оба они заряжены отрицательно и, следовательно, могут служить центрами сильного электростатического связывания поликатионов с поверхностью латексных частиц. Для изготовления модели конъюгата поликатион-антиген к ПЭП в качестве вектора химически присоединяли ХТ в расчете 1 молекула белка на полимерную цепь длиной около 1000 мономерных звеньев. Таким образом, потенциальными мишенями для конъюгата должны были служить их конкурентами – частицы латекса, покрытые БСА (БСА-латекс). Достоинство выбранной модельной системы состояло

в простоте констатации самого факта адресной доставки и фиксации конъюгатов на поверхности «клеток-мишеней», т. е. мониторинга процесса связывания ХТ-вектора с СИТ-рецептором. Для этого достаточно добавить в исследуемую систему какой-либо субстрат ХТ и следить за скоростью соответствующей ферментативной реакции. В качестве такого субстрата мы использовали нитрофенилацетат, скорость гидролиза которого легко измерить спектрофотометрически по образованию нитрофенола. Главные результаты экспериментов с описанной выше модельной системой приведены на рис. 10. Как и следовало ожидать, при раздельном смешении растворенный

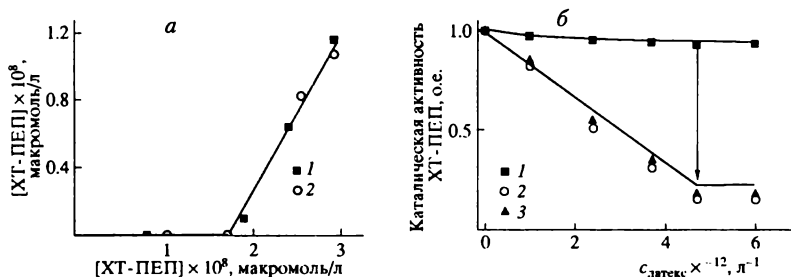
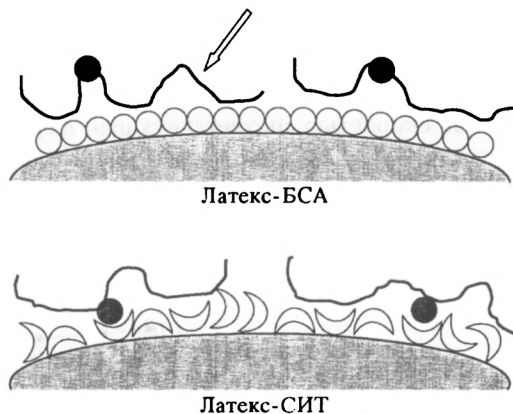


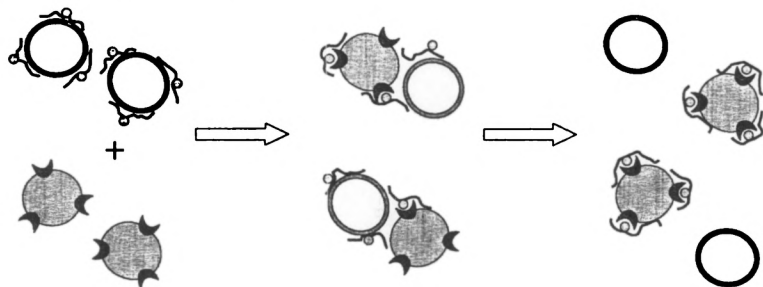
Рис. 10. Взаимодействие ХТ–ПЭП конъюгата с латексами, покрытыми БСА (Л-БСА) и СИТ (Л-СИТ): а – зависимость остаточной концентрации конъюгата в надсадочной жидкости от количества добавленного конъюгата Л-БСА (1) и Л-СИТ (2), б – изменение каталитической активности ХТ–ПЭП конъюгата при взаимодействии с Л-БСА (1), Л-СИТ (2) и их смесью (3)

в воде конъюгат ХТ–ПЭП количественно адсорбировался на каждом из двух латексов, вплоть до полного насыщения конъюгатом поверхности латексных частиц (рис. 10а). В обоих случаях картина адсорбции совпадала с той, что мы наблюдали при взаимодействии ПЭП с частицами латекса, покрытыми карбоксильными группами (рис. 8б). Вместе с тем из рис. 10б следует, что частицы БСА-латекса практически не влияли на ферментативную активность конъюгата ХТ–ПЭП, адсорбированного на их поверхности, тогда как его адсорбция на поверхности частиц СИТ-латекса сопровождалась линейным падением скорости ферментативной реакции и в конечном счете почти полным ингибированием фермента. Из этого следует, что при адсорбции конъюгата ХТ–ПЭП молекулы фермента вступали в дополнительное взаимодействие с комплементарными им молекулами СИТ. Предполагаемое различие в структуре адсорбционных слоев иллюстрирует следующая схема:



Ключевой вопрос, однако, состоял в том, может ли конъюгат ХТ–ПЭП различить частицы СИТ-латекса на фоне частиц БСА-латекса, поскольку последние также способны прочно адсорбировать ПЭП. Из данных, приведенных на рис. 106, следует, что может. Видно, что СИТ-латекс, добавленный к предварительно приготовленной смеси конъюгата ХТ–ПЭП с БСА-латексом, ингибировал изначально адсорбированный на БСА-латексе конъюгат столь же эффективно, как и в отсутствие латекса-конкурента. Измерение каталитической активности в тройной смеси каждый раз проводили через 5 мин после добавления СИТ-латекса. Иными словами, конъюгат количественно переходил с латексных частиц, покрытых БСА, на латексные частицы, покрытые СИТ, за время, не превышавшее 5 мин. Очевидно, что, как и в описанном выше случае взаимодействия ПЭП с карбоксилированным латексом, адсорбция конъюгата ХТ–ПЭП на частицах БСА-латекса необратима лишь применительно к освобождению адсорбированного конъюгата и его возвращению в исходный раствор. Однако, если между латексными частицами возникает контакт, то по месту контакта конъюгат может переходить с поверхности одной латексной частицы на другую. Таким образом, методом проб и ошибок конъюгат ХТ–ПЭП добирается до частицы СИТ-латекса. Там связанная с поликатионом молекула ХТ находит комплементарную молекулу СИТ и, образуя с ней комплекс, подобно якорю фиксирует на поверхности этой частицы весь конъюгат [30]. Процесс специфического узнавания конъюгатом частиц-мишеней среди других частиц, на которых он

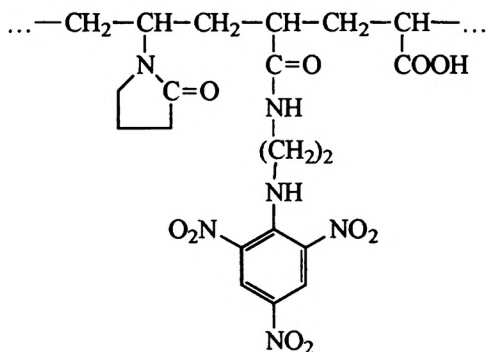
асорбируется, но неспецифическим образом, можно представить следующей схемой:



Описанные выше достаточно простые модели послужили физико-химическим обоснованием неожиданных явлений, которые иммунологи обнаружили при введении в организм конъюгированных с СПЭ антигенов.

### Полимер-субъединичные иммуногены

Простейшим примером стал сополимер акриловой кислоты (АК) с N-винилпирролидоном (ВП), к которому ковалентными связями были пришиты тринитрофенильные (ТНФ) группы [8, 9, 31]:



Сами по себе низкомолекулярные ТНФ-соединения не иммуногенны. Однако еще на заре развития иммунологии было показано, что конъюгаты ТНФ с белковыми антигенами при введении в организм вызывают иммунную реакцию, при которой специфические к ТНФ антитела образуются наряду с антителами к другим антигенным детер-



минантам белковой молекулы. Данные, приведенные на рис. 11, показывают, что конъюгат ТНФ (АК–ВП) уже при первичном вве-

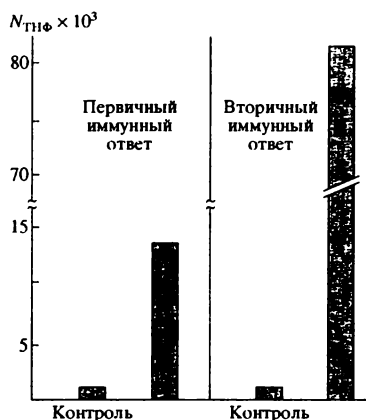
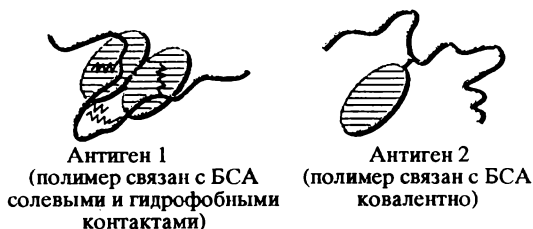


Рис. 11. Иммунный ответ у мышей на введение конъюгата ТНФ, конъюгированного с сополимером АК–ВП.  $N_{\text{ТНФ}}$  – количество ТНФ-специфических АОК на селезенку

дении вызывает образование весьма значительного числа ТНФ-специфических антителообразующих клеток (АОК) в селезенке животных. Число этих клеток, как и титр самих антител, служит мерой эффективности иммунного ответа организма на введенный антиген. Повторное введение конъюгата сопровождалось колоссальным усилением иммунной реакции. При этом иммунная система не вырабатывала никаких других антител кроме тех, которые комплементарны ТНФ.

На следующем этапе мы присоединили к СПЭ настоящий белковый антиген – БСА. В качестве СПЭ использовали две модификации цепей ПЭП. Одна содержала несколько мольных процентов гидрофобных цетильных, другая – карбоксиметиленовых групп [8, 9, 32, 33]. В глобуле сывороточных альбуминов, как известно, имеется гидрофобный «карман», способный сорбировать алифатические фрагменты молекул. Благодаря этому глобулы БСА в водном растворе сами прикреплялись к поликатионам, модифицированным гидрофобными группами. В другом варианте их прикрепляли ковалентными связями, конденсируя карбоксильные группы СПЭ с аминок группами белка.



Сам по себе БСА, как и другие сывороточные альбумины, весьма слабый антиген. Однако в связке с СПЭ он вызывал у мышей гораздо более сильную иммунную реакцию (рис. 12). В случае кова-

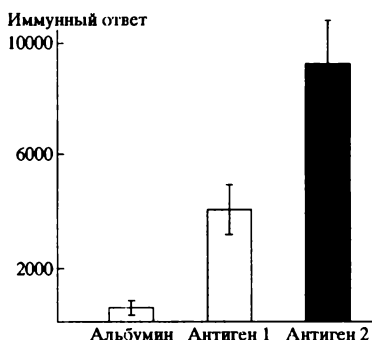
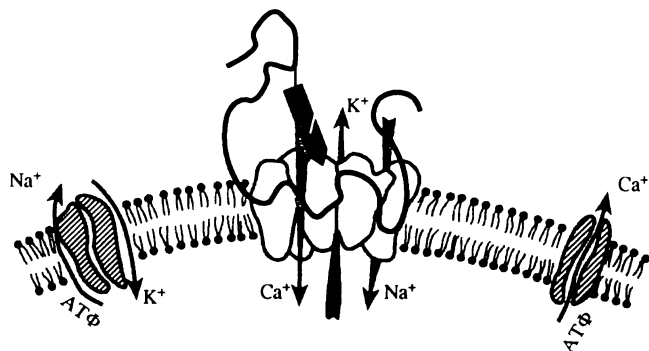


Рис. 12. Иммунный ответ (АОК) у мышей на введение БСА, его комплекса (антиген 1) и конъюгата (антиген 2) с ПЭП

лентного конъюгата усиление достигало двух десятичных порядков [32, 33].

В этом примере, как и в предыдущем, накапливавшиеся в селезенке АОК были строго специфичны по отношению к БСА. Следовательно, в условиях организма конъюгаты, как и в модельных системах, методом проб и ошибок находили клетки-мишени.

В свете полученных данных можно было полагать, что биохимический механизм запуска специфической иммунной реакции конъюгатами антиген-СПЭ аналогичен рассмотренному выше для СПЭ иммуностимуляторов. Однако в отличие от неизбирательно действующих СПЭ-полиионов действие конъюгатов фокусируется на клетках, несущих рецепторы, которые комплементарны присоединенным к СПЭ антигенам. Ситуация, складывающаяся в последнем случае во внешней мембране клетки-мишени, изображена ниже.



Впрочем, вскоре в опытах на животных – носителях IR-генов различного состава, тому были получены хотя и косвенные, но очень серьезные подтверждения, которые во многом предопределили практическую значимость всей работы в целом [8, 9, 34]. В качестве экспериментальных животных использовали мышей двух генетических линий. Одна из этих линий «nude» (*nu/nu*) искусственно выведена специально для иммунологических исследований. Мыши «nude» генетически лишены иммунной защиты. Соответственно, они не производят антител в ответ на введение им каких-либо антигенов. Мыши другой линии (*nu/+*) заметно реагируют на БСА (как уже упоминалось, относительно слабый антиген) и значительно сильнее на бычий гаммаглобулин (БГГ). Этот известный факт естественно подтвердился и в контрольных опытах (рис. 13). Основываясь на уже

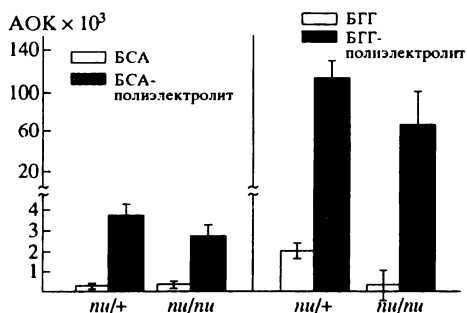


Рис. 13. Независимость силы иммунного ответа от Т-лимфоцитов-помощников.  
Пояснения в тексте

полученных данных по усилению специфического иммунного ответа у беспородных мышей на конъюгаты ТНФ–СПЭ и БСА–СПЭ, можно было ожидать обнаруженную на опыте усиленную реакцию мышей (*nu/+*) на введение как БСА, так и БГГ, конъюгированных с АК–ВП. В свете логических построений, на которые мы уже тогда опирались, нас обрадовал, но не удивил и другой результат, представленный на рис. 13. Генетически беззащитные мыши «nude» в ответ на введение конъюгатов вырабатывали почти столько же АОК, сколько и генетически защищенные. Таким образом, конъюгаты действительно запускали иммунную систему по альтернативному механизму, обходя диктат IR-генов, которые при обычном запуске контролируют эффективность иммунной реакции у отдельно взятых особей. Тем самым с помощью полимер-субъединичных иммуногенов удалось осуществить фенотипическую коррекцию иммунного ответа.

Последняя точка в системе доказательств была поставлена опытами с конъюгатом, в котором в качестве антигена был использован особый синтетический полипептид, известный в иммунологии под названием (Т,Г)–А–Л антиген [8, 9]. Он знаменит как раз тем, что благодаря очень высокой иммуногенной специфичности в свое время послужил открытию самого факта существования генов иммунного ответа [35, 36]. (Т,Г)–А–Л – это первые буквы в названиях аминокислотных остатков, из которых на самом деле состоит этот полипептид. Он представляет собой гребнеобразный сополимер, основная цепь которого – высокомолекулярный поли-*L*-лизин, а боковые ветви – пентапептиды. Каждая ветвь содержит по три остатка аланина и по одному остатку глутаминовой кислоты и тирозина, если перечислять в направлении от основной цепи. Для постановки опытов, которые должны были дать однозначный ответ на вопрос, мы приготовили конъюгат, привязав (Т,Г)–А–Л антиген к сополимеру АК–ВП. Этот конъюгат вводили мышам двух генетических линий (СВА и С57BL) и сравнивали его действие с действием свободного (Т,Г)–А–Л антигена. Результаты приведены на рис. 14. У мышей СВА IR-гены с запрограммированным иммунным ответом на (Т,Г)–А–Л последовательность вовсе отсутствуют. Соответственно, иммунная система этих мышей не реагирует на свободный (Т,Г)–А–Л антиген. У мышей С57BL с IR-генами к (Т,Г)–А–Л все в порядке, поэтому мыши этой линии в ответ на введение свободного (Т,Г)–А–Л антигена вырабатывают достаточно большое число АОК, высоко специфических по отношению к (Т,Г)–А–Л. Введение (Т,Г)–А–Л антигена, конъюгированного с сополимером АК–ВП, мышам

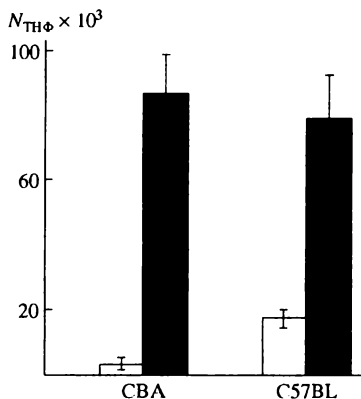


Рис. 14. Фенотипическая коррекция иммунного ответа. Пояснения в тексте

C57BL, как и в случае других конъюгированных антигенов, приводило к дополнительному многократному усилению их специфической иммунной реакции. Замечательно, однако, что и мыши CBA, вовсе не реагирующие на свободный полипептид, реагировали на его конъюгат так же сильно, как их генетически «благополучные» собратья [8, 9]. Последний факт строго доказывает, что присоединение антигена к СПЭ позволяет получить иммуногены, при иммунизации которыми действительно достигается фенотипическая коррекция иммунного ответа.

В самом деле, существование IR-генов было установлено как раз в результате обнаружения резких различий в силе иммунной реакции различных особей на один и тот же антиген, в частности полипептид (Т,Г)–А–Л. Эти различия сглаживаются при иммунизации (Т,Г)–А–Л–СПЭ конъюгатом. Поэтому степень достоверности вывода о фенотипической коррекции столь же высока, как и самого факта существования IR-генов. В данном случае коррекция не что иное, как результат запуска иммунной системы по рассмотренному выше альтернативному механизму в обход предусмотренного природой генетического контроля силы иммунного ответа.

### Экспериментальные полимер-субъединичные вакцины

На следующем этапе исследований иммунологам предстояло ответить на критически важный вопрос о том, проявятся ли у антиген-СПЭ конъюгатов протективные свойства, если в качестве антигенов к цепям полиэлектролитных иммуностимуляторов при-

шить предварительно выделенные и очищенные микробные белки или полисахариды – визитные карточки болезнетворных бактерий или вирусов. Иными словами, могут ли такие конъюгаты служить в качестве вакцин для профилактики инфекционных заболеваний. Понятно, что ответ должен был определить перспективу практического применения нового семейства иммуногенов.

Сальмонеллез стал первой из испытанных инфекций. Подопытным мышам вводили две разновидности конъюгатов (рис. 15а). В

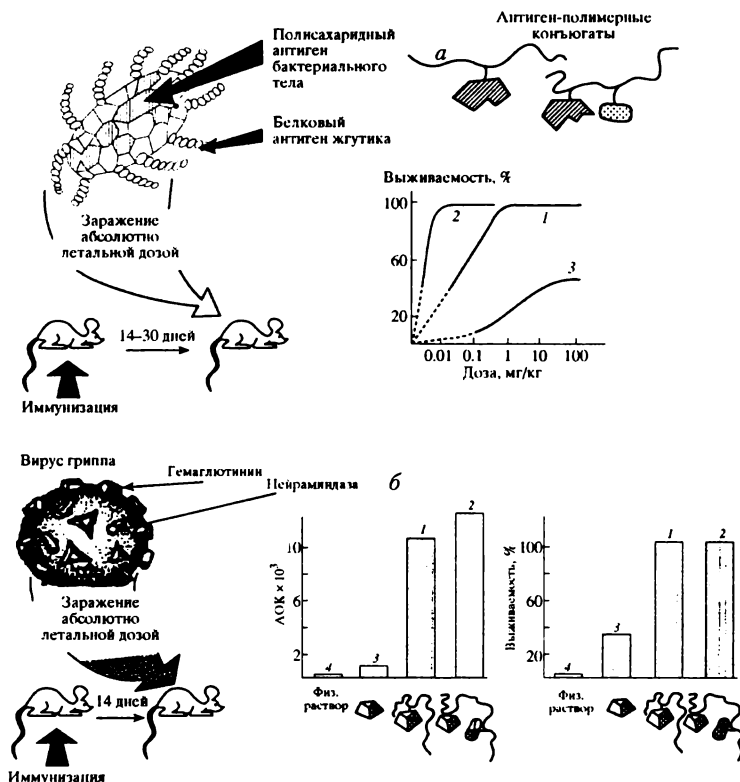


Рис. 15. Протективное действие конъюгированной противосальмонеллезной (а) и противогриппозной вакцины (б). Пояснения в тексте

одном из вариантов к сополимеру АК–ВП в качестве антигена пришивали полисахарид, выделенный из тела бактерий (иммуноген 1),

в другом – этот же полисахарид и еще флагеллин, блок из бактериальных жгутиков (иммуноген 2). Через определенный промежуток времени после иммунизации (от 14 до 30 дней) мышей заражали абсолютно смертельной дозой бактерий, после чего все животные контрольной группы, естественно, погибали. В отличие от этого все предварительно иммунизированные животные выздоравливали. Правда, в случае первого конъюгата, содержавшего только один полисахаридный антиген, для достижения 100 %-ной выживаемости требовалась иммунизация в 10 раз большей дозой, чем в случае второго (рис. 15, кривые 1 и 2). Иммунизация свободным полисахаридным антигеном в области разумных доз практически не защищала животных (кривая 3). Таким образом, было впервые показано, что антиген-СПЭ конъюгаты действительно могут служить в качестве антибактериальных вакцин.

Защита от вирусных инфекций – задача, как известно, более сложная, чем от бактериальных. Поэтому Р. В. Петров и Р. М. Хаитов, руководители иммунологической части проекта, решили начать испытания с гриппа – одной из самых распространенных и социально значимых вирусных инфекций. Для этого химики синтезировали еще два конъюгата, присоединив к сополимеру АК–ВП в качестве антигенов в одном варианте гемагглютинин (конъюгат 1), а в другом – гемагглютинин и нейраминидазу (конъюгат 2), белки, локализованные на поверхности гриппозных вирионов (рис. 15б). Оба полученных конъюгата заставляли иммунную систему подопытных мышей производить очень большое число АОК по сравнению с ничтожно малым в контрольных опытах (рис. 15б). Как и в случае бактериальной инфекции, мышей иммунизировали конъюгатами, а затем заражали абсолютно смертельной дозой вируса. Результат превзошел все ожидания. Оба конъюгата защищали всех смертельно зараженных животных (рис. 15б) [8, 9].

Более того, оказалось, что защитным действием обладают даже антиген-СПЭ конъюгаты, в которых в качестве антигенов использованы белки, не экспонированные на поверхности, а находящиеся внутри гриппозных вирионов (рис. 16). Эти белки называют «консервативными», так как их структура при переходе от одного штамма вируса к другому меняется в значительно меньшей степени. Известно, что именно структурная изменчивость поверхностных белковых антигенов создает существенные дополнительные трудности для предупреждения эпидемий гриппа при обычной вакцинации. К числу консервативных белков гриппозного вируса относятся так

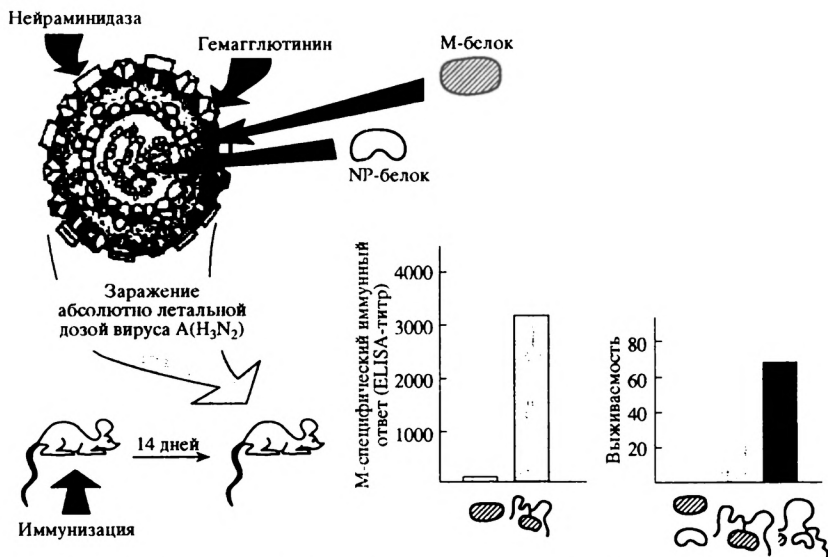


Рис. 16. Протективное действие конъюгированной противогриппозной вакцины, содержащей антигены вирусного штамма A(H<sub>1</sub>N<sub>1</sub>) при заражении вирусным штаммом A(H<sub>3</sub>N<sub>2</sub>). Пояснения в тексте

называемые М- и NP-белки. В ходе описываемого исследования они были выделены из одного из вирусных штаммов (A(H<sub>1</sub>N<sub>1</sub>)) и присоединены к СПЭ. Подопытных мышей иммунизировали этими конъюгатами, а затем заражали абсолютно смертельной дозой вирусов другого штамма (A(H<sub>3</sub>N<sub>2</sub>)). Данные, приведенные на рис. 16, показывают, что наряду с колоссальным усилением М-специфического иммунного ответа выживаемость иммунизированных мышей достигает 40–60 % при 100 %-ной смертности в контрольных опытах.

#### «Гриппол» – первая вакцина нового поколения для человека

Результаты описанных выше исследований в совокупности открыли путь к разработке полимер-субъединичных вакцин для человека. Важнейшей практической предпосылкой для этого стал описанный выше «полиоксидоний» – нетоксичный и быстро выводящийся из организма поликатионный иммуностимулятор, который, пройдя все необходимые испытания, был разрешен для медицинского применения, в том числе для внутримышечного введения. На этом этапе было принято стратегическое решение – направить все



усилия и средства на создание вакцины против гриппа – одной из самых распространенных и трудных для профилактики инфекций. Опыты на животных, о которых было рассказано в предыдущем разделе, позволяли надеяться на успех.

Вакцина «Гриппол» была получена путем ковалентного связывания гемагглютинина и нейроаминидазы – белковых антигенов вируса гриппа, с полиоксидонием [37]. Сегодня она производится в промышленном масштабе на Уфимском заводе «Иммунопрепарат» и вот уже 7 лет широко используется в медицинской практике. За эти годы были вакцинированы около 50 миллионов реципиентов и получены обширные статистические данные, свидетельствующие о высокой эффективности и полной безвредности препарата. На основании этих данных Минздрав России рекомендовал «Гриппол» в

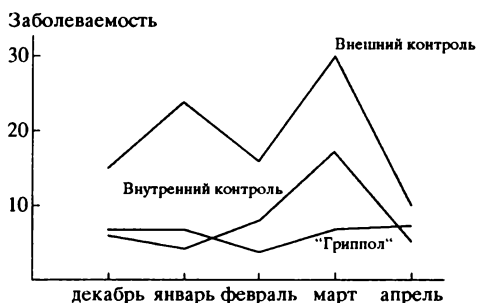


Рис. 17. Снижение заболеваемости людей, иммунизированных вакциной «Гриппол». Пояснения в тексте

качестве приоритетной противогриппозной вакцины для защиты всех групп населения. На рис. 17 приведены графики показателя заболеваемости гриппом в период эпидемии 1987–1988 гг. на одну тысячу наблюдений у людей, вакцинированных «Грипполом», не вакцинированных, но проживавших среди вакцинированных (внутренний контроль), в сравнении с никак не затронутыми вакцинацией (внешний контроль). Эти данные говорят сами за себя.

### Заключение

Остается подвести итог рассказанной здесь истории совместных поисков и многолетнего научного содружества группы химиков – сотрудников и выпускников химического факультета МГУ и группы иммунологов Института иммунологии Минздрава РФ.

Был открыт механизм иммуностимулирующего действия полиэлектролитов, который состоит в усилении миграции Т- и В-клеток, клеточной кооперации, компенсации функции Т-клеток-помощников. В основе эффекта лежит кластеризация мембранных белков адсорбированным СПЭ, сопровождающаяся повышением проницаемости мембраны для ионов калия, натрия и кальция и активацией ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ )-и  $\text{Ca}^{2+}$ -АТФаз. Важно подчеркнуть, что мембраноактивность и, соответственно, иммуностимулирующие действия, присущие, как оказалось, полиэлектролитам с весьма различным химическим строением звена, критически зависят от степени полимеризации молекулярной цепи, т. е. обусловлены «полимерностью» как таковой. Это знание послужило фундаментом для поиска полиэлектролитной структуры, отвечающей всему комплексу фармакологических требований к медицинским препаратам. В результате был синтезирован новый полиэлектролит-сополимер, построенный из звеньев 1,4-этилен-пиперазин-N-оксида и (N-карбоксиметил)-1,4-этиленпиперазинный бромида («Полиоксидоний»). Этот сополимер безвреден. Иммуностимулирующая активность в нем сочетается со способностью разрушать в условиях организма и впоследствии полностью выводиться. «Полиоксидоний» разрешен и широко используется в России в качестве иммуностимулятора. Таким образом, впервые в медицинскую практику был внедрен синтетический полимер, биологическая активность которого обусловлена прямым физико-химическим воздействием макромолекул на клетки. До этого круг синтетических полимеров для медицины ограничивался веществами, использующимися в качестве конструкционных материалов, или химически нейтральными носителями низкомолекулярных лекарств.

Был сформулирован, экспериментально обоснован и подтвержден принцип создания конъюгированных полимер-субъединичных иммуногенов и вакцин путем присоединения антигенов к СПЭ-иммуностимуляторам. Иммуногенность и протективные свойства антигенов, ковалентно связанных с СПЭ, возрастают в десятки и сотни раз. Существенно, что иммуногены и вакцины, построенные по этому принципу, действуют «в обход» ИР-генов, обеспечивая тем самым сильный иммунитет даже у организмов, генетически слабо реагирующих на данный антиген.

Использование этого принципа позволило создать первую в мире полимер-субъединичную вакцину для человека. Пример вакцины «Гриппол» открыл путь для разработки вакцин нового поколения против других опасных инфекций. Завершается разработка (клинические

и доклинические испытания) конъюгированных полимер-субъединичных вакцин против бруцеллеза, брюшного тифа, дизентерии, туберкулеза, ВИЧ, а также аллерговакцин (аллерготропинов).

Автор благодарит академика Р. В. Петрова и действительного члена Российской академии медицинских наук Р. М. Хаитова за плодотворные обсуждения в ходе подготовки этого материала к публикации.

---

\* Пленарная лекция на 17-м Менделеевском съезде по общей и прикладной химии. Казань, 21–26 сентября 2003 г.

1. Hanks E. G., Ainsworth T. J. // *Rad. Res.* 1967. Vol. 32. P. 367.
2. Воробьев А. А., Васильев Н. Н. Адъюванты. М.: Медицина, 1969.
3. Земсков В. М. // *Журн. микробиологии, эпидемиологии и иммунологии.* 1972. № 3. С. 16.
4. Евдаков В. П., Гвоздецкий А. Н., Горохов А. А. и др. // *Докл. АН СССР.* 1974. Т. 214, № 4. С. 970.
5. Петров Р. В., Кабанов В. А., Гвоздецкий А. Н. и др. // *Журн. микробиологии, эпидемиологии, иммунологии.* 1974. № 11. С. 37.
6. Diamantstein T., Vogt W., Rihl H., Bogert G. // *Eur. J. Immunol.* 1973. Vol. 3. P. 408.
7. Кабанов В. А., Мустафаев М. М., Некрасов А. В. и др. // *Докл. АН СССР.* 1984. Т. 274, № 4. С. 998.
8. Петров Р. В., Кабанов В. А., Хаитов Р. М. // *Иммунология.* 1986. № 1. С. 5.
9. Kabanov V. A. // *Makromol. Chem., Macromol. Symp.* 1986. Vol. 1. P. 101.
10. Roitt I., Brostoff J., Male D. K. // *Immunology.* London; New York: Gover Med. Publ., 1985.
11. Хаитов Р. М. Физиология иммунной системы. М.: ВИНТИ, 2001.
12. Кабанов В. А., Евдаков В. П., Мустафаев М. М., Антипина А. Д. // *Молек. биол.* 1977. Т. 11. С. 5.
13. Kabanov V. A., Zerin A. B., Mustafaev M. I., Kasaikin V. A. // *Polymeric Amines and Ammonium Salts* / Ed. by E. J. Goethals Oxford; New York: Pergamon Press. 1980. P. 173.
14. Зайцев В. С., Изумрудов В. А., Зезин А. Б., Кабанов В. А. // *Докл. АН СССР.* 1992. Т. 322, № 2. С. 318.
15. Атауллаханов Р. Н., Петров Р. В., Хаитов Р. М. и др. // *Докл. АН СССР.* 1984. Т. 274, № 2. С. 479.
16. Петров Р. В., Хаитов Р. М., Атауллаханов Р. И. // *Биол. мембраны.* 1984. Т. 1. С. 599.
17. Разводовский Е. Ф., Берлин Ал. Ал., Некрасов А. В. и др. // *Высокомолек.*

соед. А. 1973. Т. 15, № 10. С. 2219.

18. Разводоовский Е.Ф., Берлин Ал. Ал., Некрасов А. В. и др. // Высокомолек. соед. А. 1973. Т. 15, № 10. С. 2233.

19. Rasvodovskii E. F., Nekrasov A. V., Pushchaeva L. M. et al. // J. Macromol. Sci., Chem. 1984. Vol. 8, № 2. P. 241.

20. Пучкова Н. Г., Некрасов А. В., Разводоовский Е. Ф., Эльцефон Б. С. // Высокомолек. соед. А. 1980. Т. 22, № 6. С. 1281.

21. Pat. 5.503,830 USA. 1996.

22. Некрасов А. В., Пучкова Н. Г. // Высокомолек. соед. Б. 1983. Т. 25, № 9. С. 691.

23. Izumrudov V. A., Savitskii A. P., Bakeev K. N. et al. // Makromol. Chem., Rapid Commun. 1984. Vol. 5. P. 709.

24. Кабанов В. А. // Высокомолек. соед. А. 1994. Т. 36, № 2. С. 183.

25. Бакеев К. Н., Изумрудов В. А., Кучанов С. И. и др. // Докл. АН СССР. 1988. Т. 300, № 1. С. 132.

26. Ярославов А. А. 1988 (неопубликованные данные).

27. Сухишвили С. А., Полинский А. С., Ярославов А. А. и др. // Докл. АН СССР. 1988. Т. 302, № 2. С. 381.

28. Yaroslavov A. A., Polynsky A. S., Sukhishvili S. A., Kabanov V. A. // Makromol. Chem., Macromol. Symp. 1989. Vol. 26. P. 265.

29. Kabanov V. A., Yaroslavov A. A., Sukhishvili S. A. // J. Controlled Release. 1996. Vol. 39. P. 173.

30. Kabanov V. A., Yaroslavov A. A., Boronina O. V., Sukhishvili S. A. // J. Bioactive Compatible Polym. 1995. Vol. 10. P. 41.

31. Петров Р. В., Евдаков В. П., Хаитов Р. М. и др. // Докл. АН СССР. 1977. Т. 236, № 5. С. 1260.

32. Кабанов В. А., Мустафаев М. И., Норимов А. Ш. и др. // Докл. АН СССР. 1978. Т. 243, № 5. С. 1330.

33. Петров Р. В., Хаитов Р. М., Норимов А. Ш. и др. // Докл. АН СССР. 1979. Т. 249, № 1. С. 249.

34. Виноградов И. В., Кабанов В. А., Мустафаев М. И. и др. // Докл. АН СССР. 1982. Т. 263, № 1. С. 228.

35. Sela M. // Science. 1969. Vol. 166. P. 1365.

36. Benacerraf B. // Ann. Immunol. C. 1974. Vol. 125. P. 143.

37. Petrov R. V., Kabanov V. A., Khaitov R. M. et al. // Allergy and Clinical Immunology. 2003. Vol. 15. P. 56.